

論文内容の要旨

論文提出者氏名 木田 節

論文題目

Roles of high-mobility group box 1 and thrombin in murine pulmonary fibrosis and the therapeutic potential of thrombomodulin.

論文内容の要旨

肺線維症は遺伝や自己免疫、放射線、薬剤など様々な要因によって生じる慢性進行性の線維化疾患であるが、いずれのタイプも急性・亜急性の致死的な経過をとることがあり、共通してびまん性肺胞傷害（diffuse alveolar damage; DAD）と呼ばれる組織学的所見を示すことが知られている。近年、この DAD の病態において、炎症と凝固のクロストークが線維化の促進に関与している可能性が示唆されているが、数多ある炎症性メディエーターや凝固カスケードに対し、どのような治療戦略が最適かはまだわかっていない。

Thrombomodulin は血管内皮細胞が発現し、凝固因子である thrombin を捕捉したり、炎症性メディエーターである high-mobility group box 1 (HMGB1) を吸着するなどの機序により、内因性の抗炎症・抗凝固物質としてホメオスタシスの維持に機能している糖タンパク質である。今回、申請者は急性肺傷害に引き続いて肺線維症を呈する動物モデルであるブレオマイシン誘導肺線維症を用いて、肺線維症の病態における HMGB1 と thrombin の役割を解明し、thrombomodulin による治療の可能性について検証することを目的として以下の研究を行った。

C57BL/6 マウスにブレオマイシンを気管内に単回投与することで肺線維症を誘導した。本モデルでは、ブレオマイシン投与から約 7 日後までに各種炎症性メディエーターが活性化し（急性炎症期）、7 日後以降に線維化促進性のメディエーターが活性化することが知られている（線維化期）。まず初めに、ブレオマイシン投与後の気管支肺胞洗浄液および肺組織における HMGB1 と thrombin の発現の経時的変化について enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) と免疫組織染色を用いて検討を行った。HMGB1 および thrombin (肺胞洗浄液中の thrombin 形成マーカーとして thrombin-antithrombin complex を測定した) は急性炎症期において他の炎症性サイトカインとともに発現が亢進し、線維化メディエーターである transforming growth factor (TGF)- β 1 や α -smooth muscle actin (SMA) が発現してくる線維化期においてもその発現が維持されていた。また、免疫蛍光二重染色により、健常肺では HMGB1 は核内蛋白としてユビキタスに発現しているが、ブレオマイシン投与後には E-cadherin 陽性の気道上皮細胞や CD68 陽性のマクロファージにおいて細胞質への移行が認められることがわかった。このことは HMGB1 が炎症組織において傷害を受けた体細胞や浸潤してきた炎症細胞から受動的ないし能動的に放出されるとい

う既知の知見と矛盾しないものであった。また同様の免疫蛍光二重染色により、TGF- β 1 の主な産生源は CD68 陽性のマクロファージと考えられた。

次にマクロファージにおける TGF- β 1 の産生、および肺線維芽細胞における α -SMA の発現に HMGB1 や thrombin が関与しているかを調べるため、健常マウスの肺から肺胞マクロファージ (AM) と肺線維芽細胞 (LFB) を単離し、in vitro での刺激実験を行った。AM の培養条件に 100 ng/ml の HMGB1 ないし 200 ng/ml の thrombin の添加を行ったところ、TGF- β 1 の mRNA の発現亢進が確認され、この反応は recombinant human thrombomodulin (rhTM) の同時添加により阻害された。TGF- β 1 の蛋白質レベルでの発現亢進は免疫細胞染色および培養上清の ELISA により確認できた。同様に、LFB の培養条件に 200 ng/ml の thrombin の添加を行ったところ、 α -SMA の mRNA の発現亢進が確認され、この反応は rhTM の同時添加により阻害された。HMGB1 の様々な濃度の添加では α -SMA の発現亢進は確認されなかった。 α -SMA の蛋白質レベルでの発現亢進は免疫細胞染色およびウェスタンブロットにより確認できた。以上より、AM における TGF- β 1 の産生に HMGB1 および thrombin が、LFB における α -SMA の発現に Thrombin が関与していることが明らかとなった。

最後に rhTM の肺線維症に対する in vivo での効果を調べるために、ブレオマイシン誘導肺線維症に対する rhTM による治療介入を行った。ブレオマイシン投与後の急性炎症期に rhTM の投与を行ったところ、rhTM 非投与マウスと比較して体重減少、肺組織における線維化の程度およびコラーゲンの沈着量が有意に軽減し、肺線維症が抑制されることがわかった。さらに、線維化期に rhTM の投与を行った場合にも、肺線維症は抑制されたが、その効果は投与開始時期が遅れるとともに減少していくという結果が得られた。

本研究では、ブレオマイシン誘導肺線維症において HMGB1 および thrombin の発現が亢進し、TGF- β 1 や α -SMA の産生を誘導することで病態に関与していること、rhTM はこれらをともに阻害することで肺線維症に対し抑制的に作用することを明らかとした。ヒトの特発性肺線維症の急性増悪においても、傷害を受けた肺胞において血管内皮の thrombomodulin の発現が低下しており、血中の HMGB1 や TAT の濃度上昇が予後と関連するといった知見が報告されており、DAD として特徴づけられるような肺胞の構造破壊そのものが、炎症・凝固の活性化を介して線維化を誘導する、という共通病態の存在が示唆される。これに対し、HMGB1 および thrombin の両方の制御を目的とした thrombomodulin の補充を、その病因ごとの根本治療と組み合わせて行うことは、急性・亜急性の肺線維症に対する普遍的な治療戦略として有望である可能性がある。rhTM はすでに DIC に対する治療薬として本邦で承認されている薬剤であり、肺線維症に対する臨床応用にも期待がもたれる。